

ストローの融解プロトコル

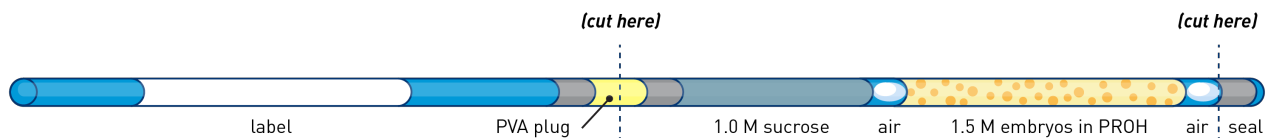
2004年6月23日改訂

融解に必要なもの (参考)

- 液体窒素入りデュワー瓶
- 25°Cのウォーターバス
- はさみ (ストローカッター)
- キムワイプ
- プランジャー (同梱)
- タイマー
- ピンセット
- ピペッター
- 1ml の M2 を入れた 35×10mm のファルコンディッシュ
- M2 培地 –EmbryoMax® M2 Medium (1X), Liquid, with Phenol Red(Catalog Number: MR-015-D)
M2 medium | MR-015-D (merckmillipore.com)

融解プロトコル

The Jackson Laboratory Frozen Embryo Repository (ジャクソン研究所の凍結胚貯蔵施設) で使用されている凍結と融解の手順は、Renard, J.P.と Babinet, C.によって説明された手順に基づいています。[Renard, J.P. and Babinet, C. (1984). High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straw with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *Journal of Experimental Zoology* 230, 443-448]



- ストローを液体窒素保管容器から液体窒素を入れた小さい容器 (デュワー瓶など) にできるだけ素早く移動します。
- ストローのラベル付近をピンセットで持ち、液体窒素下より取り出して、空気中で 40 秒間保持します。
- ストローをラベルの位置まで室温のウォーターバス (25°C) に入れます。ストロー内の溶液が完全に溶けるまで (5~10 秒) 待ちます。(目安: ストロー内の氷がなくなるまで)
- キムワイプでストローを丁寧に拭きます。
- 胚側でストローをしっかりと保持し、PVA プラグ (黄色がかった色) の真ん中を切断します。
- シール付近でストローを持ち、シール部分を切り落とします。
- 人差し指と親指を使って、胚の近くでストローの端を丸めます。
- プランジャーを用いて綿栓を押し出し、ストローの液体内容を 35 mm のファルコンディッシュにすべて押し出します。この時、綿栓をディッシュに落とさないように注意してください。
- 5分お待ち下さい。胚はかなり収縮します。
- 胚を 1ml の M2 に移動します。胚は急速に水分を吸収し、通常の外観になります。
- 1ml の M2 培地が入ったディッシュで 10 回洗浄します。それぞれのディッシュでは、新しいピペットチップもしくはガラスキャピラリーを使用してください。

※融解して回収した胚は、培養培地に移動し、できるだけ早急にレシピエントへの胚移植作業を実施してください。